

EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA MATERNIDADE SOBRE O BEM-ESTAR DE CAMUNDONGOS CRIADOS EM BIOTÉRIO
(Effects of environmental enrichment on motherhood on the welfare of mice bred in vivarium)

Hisly Any Stiegelmeier Medeiros, Bernardo Graça Fatori Deguchi, Vanessa Carli Bones,
Carla Forte Maiolino Molento¹

¹ Correspondência: carlamolento@yahoo.com

RESUMO: Objetivou-se verificar os efeitos do enriquecimento ambiental (EA) sobre o bem-estar de camundongos em maternidade de um biotério. Para isso, camundongos Swiss da maternidade do biotério da Universidade Positivo foram separados ao acaso em dois grupos de seis fêmeas cada, sendo um grupo com enriquecimento (CE), constituído de papel para a confecção de ninho, e outro grupo sem enriquecimento (SE); duas fêmeas foram alocadas em cada caixa. Foram avaliados os comportamentos exploratório (EXP), agonístico (AGO), de autocuidado (CUI), interação com enriquecimento (IE), interação com filhotes (IF), interação entre mães (IM) e alimentação (ALI), comparados em geral e ao longo de nove dias de filmagens. Na comparação geral, o comportamento AGO foi menor no grupo CE ($P = 0,047$); no entanto, a mediana foi igual a 0% para ambos os grupos. Ao longo dos dias, houve diferença ($P < 0,05$) nos comportamentos EXP, IF, e ALI em ambos os grupos, com a diminuição do tempo de EXP e aumento do tempo de IF e de ALI. Houve diferença ($P < 0,05$) nas medianas de CUI e IM, indicando variação ao longo dos dias no grupo SE, e não houve diferença no CE ($P > 0,05$), o que significa que em CE, CUI e IM ocorreram de forma mais contínua. Ainda no grupo CE, houve variação ($P < 0,05$) de IE, evidenciando diminuição ao longo dos dias, passando de 29% no primeiro dia para 1% no último dia. O grupo CE apresentou maior variação na expressão de comportamento AGO ($P < 0,05$), enquanto no SE não houve diferença ($P > 0,05$), o que indica que AGO não variou ao longo dos dias. Conclui-se que o EA melhora o convívio entre os animais, diminuindo comportamentos agonísticos e favorecendo o comportamento natural de nidificação. Devido ao impacto positivo, mais estudos sobre as formas de EA para camundongos são relevantes.

Palavras-chave: animais de laboratório; comportamento agonístico; confecção de ninho; interação entre mãe e filhote; roedores

ABSTRACT: The present study aimed to assess the effects of environmental enrichment (EA) on the welfare of mice in maternity of a vivarium. For this, Swiss mice of the maternity of the Positivo University vivarium were separated randomly into two groups of six females each, one group with enrichment (CE), consisting of paper for making the nest, and another group without enrichment (SE); two females were placed in each box. The behaviors evaluated were exploratory (EXP), agonistic (AGO), self-care (CUI), interaction with enrichment (IE), interaction with pups (IF), interaction between mothers (IM) and food (ALI), compared in general and throughout nine days of filming. Regarding the general comparison, the AGO behavior was lower in the CE group ($P = 0.047$); however, the median was equal to 0% for both groups. Throughout the days, the behaviors EXP, IF, and ALI in both groups showed differences ($P < 0.05$), with decreasing length of EXP and increasing length of IF and ALI. There were differences ($P < 0.05$) in the median of CUI and IM, indicating variation throughout the days on the SE group, and no difference on the CE ($P > 0.05$), meaning that in CE, CUI and IM occurred in a more continuous way. Still in the CE group, there was variation ($P < 0.05$) of IE, showing a decrease throughout the days, from 29% in the first day to 1% on the last day. The CE group showed a greater variation in the expression of the AGO behavior ($P < 0.05$), while in SE there was no difference ($P > 0.05$), indicating that AGO did not vary throughout the days. We conclude that EA improves the interaction between animals, decreasing agonistic behaviors and encouraging the natural nesting behavior. Due to the positive impact, most studies on ways to EA for mice are relevant

Key Words: agonistic behavior; interaction between mother and puppy; laboratory animals; nest making; rodents

INTRODUÇÃO

Segundo Van Herck *et al.* (1994), experimentos em animais só devem ser realizados quando nenhuma alternativa está disponível e quando o benefício da experiência supera o sofrimento animal. Entretanto, quando os animais são utilizados há uma obrigação legal (Brasil, 2008) e moral de salvaguardar o bem-estar e minimizar o desconforto, o que gera benefícios tanto para o animal como para o resultado experimental.

Segundo Broom (1986), o bem-estar de um indivíduo é seu estado em relação às suas tentativas de se adaptar ao seu ambiente. Como uma forma de favorecer essa adaptação ao ambiente, surgiram as técnicas de enriquecimento ambiental, cujo objetivo principal é dar ao animal em cativeiro condições que estimulem seu comportamento natural e que possam aumentar o seu conforto (Fox e Harrison, 2006; Frajblat *et al.*, 2008). Este enriquecimento consiste na exposição de animais a ambientes ricos em estimulação sensorial, gerada por objetos como rodas de atividades, canos e brinquedos, caixas com infraestruturas mais complexas, contendo tocas, galerias de túneis e plataformas com diferentes níveis de acesso (Chamove, 1989; Mellen e Macphee, 2001; Zimmermann *et al.*, 2001).

Em relação aos animais de laboratório, uma série de parâmetros fisiológicos e comportamentais podem ser alterados com o enriquecimento ambiental. Por exemplo, podem ser citados diminuição do nível de excitabilidade dos animais diante dos procedimentos de manipulação, melhora nas condições gerais de saúde, diminuição dos níveis de agressão intra-específica, diminuição dos níveis circulantes de hormônios supra-renais associados ao estresse, diminuição da frequência de comportamentos estereotípicos, menor incidência de perda de filhotes por infanticídio,

canibalismo e negligência, maior taxa de sucesso de acasalamento e melhora no comportamento social com o grupo (Reinhardt e Reinhardt, 2006; Frajblat *et al.*, 2008).

No presente trabalho objetivou-se verificar os efeitos do enriquecimento ambiental na maternidade, comparando-se o comportamento dos camundongos submetidos ao enriquecimento ambiental com o dos camundongos sem enriquecimento ambiental, utilizando-se de materiais de alta viabilidade e que não oferecem riscos à segurança sanitária do biotério, nas condições específicas de um biotério brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 fêmeas de camundongos (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, em período de gestação e aleitamento, selecionadas ao acaso na maternidade do biotério da Universidade Positivo de Curitiba/PR, sendo seis fêmeas no grupo sem enriquecimento (SE) e seis fêmeas no grupo com enriquecimento ambiental (CE), alojadas em pares. O experimento foi desenvolvido entre maio e junho de 2012.

As seis fêmeas do grupo SE foram alocadas em moradias padrão, em caixas com 504 cm², maravalha, grade de ferro e garrafas com água. As seis fêmeas do grupo CE foram alocadas em moradias iguais às descritas para o grupo SE, mas com papel disponível para confecção de ninhinhos, sendo: uma folha dupla de lenço higiênico marca Kleenex® com 14,2 cm de comprimento por 21,2 cm de largura e uma folha de papel toalha da marca Neve® com 20,3 cm de comprimento por 22,3 cm de largura. No procedimento de limpeza dos tratamentos com EA, os papéis fornecidos na troca anterior foram parcialmente colocados na caixa. Seguindo as normas de funcionamento

do biotério, os procedimentos de limpeza, troca de materiais, reposição de água e ração e dos itens de EA foram realizados nas segundas e quintas-feiras pela equipe responsável pelo experimento.

Os animais foram mantidos sob ciclo diurno/noturno de 12/12 horas com o fotoperíodo das 08:00h às 20:00h nos dois primeiros dias do experimento, e com o fotoperíodo das 09:00h às 21:00h nos demais dias do experimento. Os comportamentos exibidos pelos animais foram registrados em vídeo com auxílio de uma câmera digital Sony DSLR, para possibilitar a utilização do método de observação contínua do comportamento de cada animal. Foram realizadas filmagens no dia do início do experimento (D0), e nos dias subsequentes duas vezes por semana, nos dias quatro (D4), sete (D7), onze (D11), treze (D13), dezoito (D18), vinte e um (D21), vinte e cinco (D25) e vinte e oito (D28). Tais filmagens ocorreram imediatamente após a limpeza das caixas (das 09:30h às 10:00h) nos dias 0, 7, 11, 18, 21, 25 e 28, das 10:20h às 10:50h no dia 13, e antes da limpeza das caixas (das 08:20h às 08:50h) no dia 4. As filmagens tiveram duração de 4 minutos por caixa em cada dia, totalizando 216 minutos. Cada vídeo foi analisado duas vezes para a verificação do comportamento dos dois animais, desta forma foram analisados 432 minutos de filmagens.

Os comportamentos foram quantificados de acordo com a porcentagem em relação à duração total de comportamentos realizados por cada grupo experimental por dia de filmagem. Embora todos os comportamentos realizados foram quantificados, foram escolhidos para a análise apenas aqueles que serviram como indicadores do Bem-estar Animal (BEA), relacionados principalmente aos instantes após a limpeza. Logo, os comportamentos exploratórios (EXP), agonísticos (AGO), de autocuidado

(CUI), interação com filhotes (IF), interação entre mães (IM), alimentação (ALI) e aqueles de interação com enriquecimento (IE) (Tabela 1), foram selecionados visto que apresentam importância após a alteração do ambiente (Jolles *et al.*, 1979b; Gray e Hurst, 1995; Van Loo *et al.*, 2000; Burn *et al.*, 2006; Brennes *et al.*, 2008; Burn e Mason, 2008; Gross *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Comportamentos apresentados pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas sem enriquecimento (SE) e pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com enriquecimento ambiental (CE), no período de maio a junho de 2012.

Comportamento	Descrição
Exploratório	Farejar o substrato, o ambiente interno e externo à caixa, cavar e movimentar o substrato.
Agonístico	Perseguir, adotar posições de submissão ou dominância, limpar ou farejar de forma agressiva.
Autocuidado	Realizar limpeza corporal.
Interação com filhotes	Farejar, carregar ou amamentar os filhotes.
Interação entre mães	Limpar ou farejar de forma não agressiva, uma fêmea dormir próxima à outra.
Alimentação	Comer e beber água.
Interação com o EA	Farejar, mastigar, esconder-se embaixo e manipular os objetos oferecidos.

O comportamento de interação com os filhotes passou a ser registrado a partir do dia 11 para as caixas 1, 2, 4, 5 e 6 e, a partir do dia 13 para a caixa 3, sendo que nestas datas ocorreram o nascimento dos filhotes.

Foi avaliado o comportamento materno e a interação entre as fêmeas dos grupos SE e CE, bem como a interação das fêmeas do grupo CE com o enriquecimento, de forma geral e sua variação ao longo dos nove dias de experimento. Os dados representados em minutos de observação foram tabulados em planilhas eletrônicas, transformados em porcentagem e em medianas. Em seguida as medianas em cada grupo passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e foram analisadas por estatística não-paramétrica por meio do teste de Mann-Whitney, seguido do teste de Friedman

para comparação dos resultados ao longo dos nove dias de experimento. Tais testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa SPSS Statistics 19®. As medianas apresentadas nas tabelas podem ser iguais à zero em alguns casos, no entanto pode haver diferenças significativas; os testes realizados fazem uso de ranques calculados e não diretamente a mediana, assim podem ser encontradas diferenças (Abdi, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados dos comportamentos observados não apresentaram distribuição normal ($P < 0,05$) pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Na comparação geral (Tabela 2), somente o comportamento AGO apresentou diferença ($P = 0,047$) entre os grupos SE e CE, sendo menor no grupo CE, mas as medianas foram de 0% para ambos. Não houve diferença de tempo despendido para a execução de comportamentos exploratórios na comparação geral entre os grupos. Tal resultado difere de Abou-Ismael *et al.* (2010), que observaram que, em ratos, a frequência dos comportamentos exploratórios foi inferior em animais com enriquecimento ambiental (EA). Os camundongos apresentam características de comportamento anti-predatório e estruturas sociais complexas que são favorecidas quando estímulos exploratórios são ofertados (Mench, 1998).

Tabela 2 - Comparação geral dos comportamentos apresentados pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas sem enriquecimento (SE) e pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com enriquecimento ambiental (CE), no período de maio a junho de 2012.

Comportamento	Grupo	Mediana ± DAM ¹	Mínimo/Máximo	N ²	Ranque Médio	Val de
EXP	Geral	27,02%		108		
	SE	30,57% ± 3,55%	0,00% / 79,51%	54	57,21	0,3
	CE	24,47% ± 2,55%	0,00% / 67,16%	54	51,79	
AGO	Geral	0,00%		108		
	SE	0,00% ± 0,00%	0,00% / 4,72%	54	59,47	0,04
	CE	0,00% ± 0,00%	0,00% / 4,98%	54	49,53	
CUI	Geral	8,20%		108		
	SE	6,95% ± 1,25%	0,00% / 54,15%	54	51,49	0,3
	CE	10,74% ± 2,54%	0,00% / 53,21%	54	57,51	
IF	Geral	0,00%		108		
	SE	0,00% ± 0,00%	0,00% / 91,71%	54	56,31	0,5
	CE	0,00% ± 0,00%	0,00% / 74,65%	54	52,69	
IM	Geral	0,00%		108		
	SE	0,00% ± 0,00%	0,00% / 38,46%	54	55,31	0,7
	CE	0,00% ± 0,00%	0,00% / 60,38%	54	53,69	
ALI	Geral	23,91%		108		
	SE	33,60% ± 9,69%	0,00% / 91,56%	54	57,46	0,3
	CE	17,89% ± 6,02%	0,00% / 100,00%	54	51,54	
IE	Geral	4,68%		54		
	SE	- - -	-	-	0,00	
	CE	4,68% ± 0,00%	0,00% / 60,54%	54	27,50	

¹ Desvio absoluto da mediana; ² número de observações e * significância a 5% no teste de Mann-Whitney

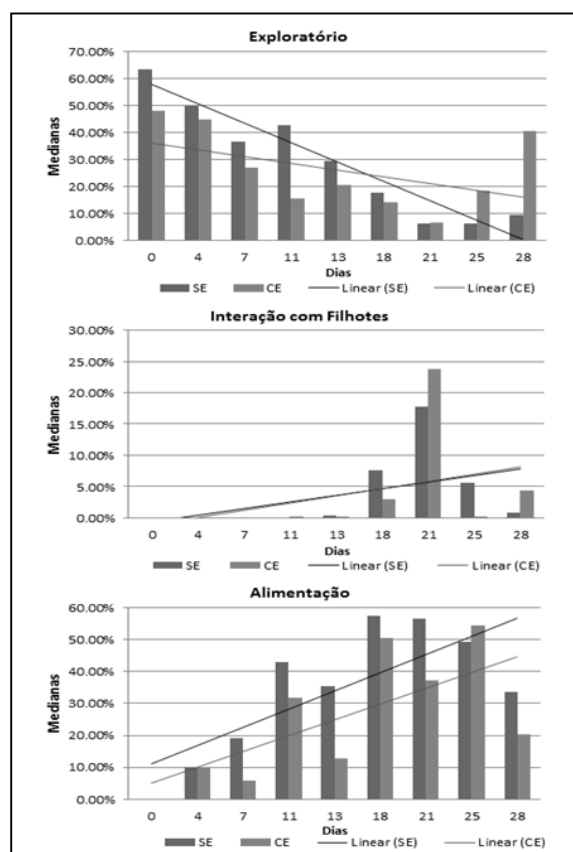
A Tabela 3 apresenta os dados das observações dos comportamentos ao longo dos dias. Os comportamentos EXP, IF e ALI apresentaram diferença ($P < 0,05$) em ambos os grupos, indicando variação ao longo dos dias, com a diminuição do EXP e aumento do tempo de IF e de ALI (Figura 1), devido possivelmente à maior movimentação dos filhotes em busca das fêmeas para mamar e à maior demanda destas por alimento, o que normalmente é observado nas fêmeas em maternidade.

Tabela 3 - Comparação dos comportamentos apresentados ao longo dos dias pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas sem enriquecimento (SE) e pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com enriquecimento ambiental (CE), com a ocorrência dos nascimentos nos dias 11 e 13, no período de maio a junho de 2012.

Comportamento / Grupo	Dias											N ^o	Valor de P
	D0	D4	D7	D11	D13	D18	D21	D25	D28				
EXP	SE (%)	63,56	49,78	36,55	42,91	29,61	17,56	6,45	6,35	9,41		6	0,0006*
	DAM ¹ ±	32,99	19,21	5,98	12,34	0,96	13,00	24,12	24,22	21,16			
	RM ²	8,50	6,50	5,17	6,83	5,50	3,67	2,67	2,33	3,83			
	CE (%)	48,00	44,83	27,03	15,54	20,60	14,07	6,59	18,35	40,73		6	0,0276*
	DAM ¹ ±	23,54	20,37	2,56	8,93	3,87	10,40	17,88	6,12	16,26			
	RM ²	7,83	6,00	5,67	3,83	4,67	4,50	2,00	4,50	6,00			
AGO	SE (%)	0,00	1,07	0,24	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00		6	0,0772
	DAM ¹ ±	0,00	1,07	0,24	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00			
	RM ²	4,75	5,83	4,42	5,08	7,83	3,08	4,17	5,17	4,67			
	CE (%)	0,00	0,00	0,00	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		6	0,0236*
	DAM ¹ ±	0,00	0,00	0,00	1,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
	RM ²	4,00	4,00	4,00	7,33	5,50	5,83	4,00	5,17	5,17			
CUI	SE (%)	10,61	27,61	7,00	7,09	5,24	10,87	0,00	0,00	11,43		6	0,0162*
	DAM ¹ ±	3,67	20,66	0,06	0,14	1,71	3,93	6,95	6,95	4,48			
	RM ²	6,50	7,00	5,33	5,33	5,00	5,25	2,00	2,50	6,08			
	CE (%)	12,35	25,16	12,35	20,60	11,87	9,18	0,68	2,46	21,27		6	0,1777
	DAM ¹ ±	1,61	14,42	1,61	9,86	1,13	1,56	10,05	8,27	10,53			
	RM ²	4,67	6,33	5,33	6,00	6,00	4,67	2,75	3,08	6,17			
IF	SE (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	7,56	17,84	5,64	0,78		6	0,0331*
	DAM ¹ ±	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	7,56	17,84	5,64	0,78			
	RM ²	2,92	2,92	5,00	4,33	5,00	5,92	7,50	5,58	5,83			
	CE (%)	0,00	0,00	0,00	0,21	0,18	2,99	23,79	0,21	4,37		6	0,0326*
	DAM ¹ ±	0,00	0,00	0,00	0,21	0,18	2,99	23,79	0,21	4,37			
	RM ²	3,08	3,08	4,00	5,33	5,33	5,67	7,42	5,17	5,92			
IM	SE (%)	0,00	3,36	5,28	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00		6	0,0005*
	DAM ¹ ±	0,00	3,36	5,28	0,00	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00			
	RM ²	3,50	7,42	8,33	4,58	6,08	4,17	4,33	3,08	3,50			

Figura 1 - Medianas dos comportamentos EXP, IF e ALI ao longo dos dias, apresentados pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas sem enriquecimento (SE) e pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com enriquecimento ambiental (CE), no período de maio a junho de 2012.

Houve diferença ($P < 0,05$) nas medianas de CUI e IM ao longo dos dias no grupo SE, indicando variação ao longo dos dias, e não houve diferença no grupo CE ($P > 0,05$), o que indica que em CE, CUI e IM ocorreram de forma mais contínua ao longo do período avaliado (Figura 2). Mesmo não havendo diferença significativa no grupo CE, observou-se uma tendência de redução do comportamento de autocuidado em ambos os grupos, resultado que está de acordo com outros autores (Marashi *et al.*, 2003; Rosenfeld e Weller, 2012). O aumento no autocuidado ocorre em situações de habituação a um novo estímulo ou ambiente (Jolles *et al.*, 1979b; Amaral *et al.*, 2008; Brennes *et al.*, 2008; Vivinetto *et al.*, 2013), situação a qual todos os animais do experimento foram expostos após a limpeza; no caso do presente estudo a colocação de material de ninho já utilizado anteriormente pode ter influenciado os animais com EA a reduzirem o comportamento de autocuidado, mas de forma menos acentuada do que em SE e sem apresentar diferença em relação ao grupo SE na comparação geral. O autocuidado excessivo também pode caracterizar estereotipias resultantes de frustrações, conflitos com outros animais ou estímulos novos (Jolles *et al.*, 1979b). No entanto, cabe ressaltar que a presença de novos itens no ambiente dos animais não é um pré-requisito para o aparecimento de autocuidado excessivo (Jolles *et al.*, 1979a). Em relação à IM, mesmo tendo ocorrido de



forma mais contínua ao longo dos dias no grupo CE, sua duração foi menor em CE do que em SE (Figura 2). Isso pode ter ocorrido porque no grupo CE havia EA, e as fêmeas puderam utilizar o tempo para realizar outras atividades, enquanto que no grupo SE as fêmeas continuaram em sua rotina normal, mantendo maior proporção do tempo em comportamentos de interação, tanto interação agonística como não agonística.

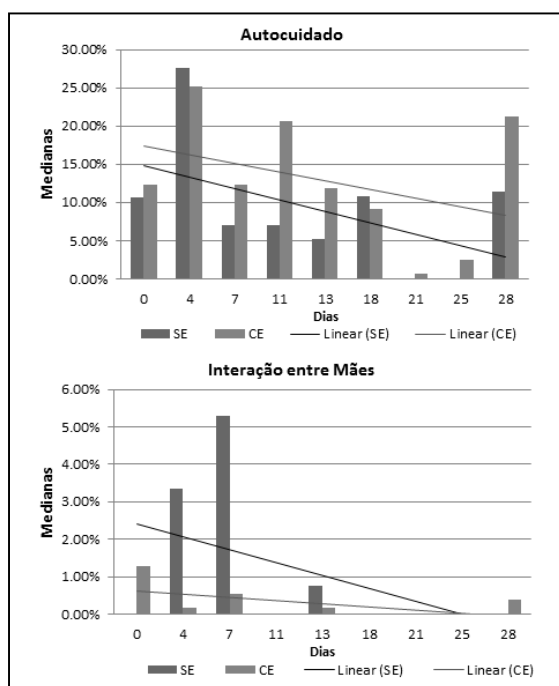


Figura 2 - Medianas dos comportamentos CUI e IM ao longo dos dias, apresentados pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas sem enriquecimento (SE) e pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com enriquecimento ambiental (CE), no período de maio a junho de 2012.

O grupo CE apresentou maior variação na expressão de comportamento AGO ($P < 0,05$); no SE não houve diferença ($P > 0,05$), o que indica que AGO não variou ao longo dos dias (Figura 3). Quando ocorrem eventos agressivos os animais podem vir a

desenvolver ferimentos graves com difícil tratamento que podem vir a ser uma das causas da eutanásia em animais (Nas 2010; Wolfensohn, 2010; Avma, 2013). Porém, nos dois grupos estudados no presente trabalho a ocorrência de comportamentos agonísticos manteve-se baixa e todas as medianas deste comportamento foram zero. No entanto, na comparação geral, somente o comportamento AGO apresentou diferença entre os grupos SE e CE, sendo menor para o grupo CE. Animais que receberam EA podem desenvolver tanto aumento (Marashi *et al.*, 2003) como redução nos níveis de comportamentos agressivos (Pietropaolo *et al.*, 2004; Abou-Ismael *et al.*, 2010). Segundo Van Loo *et al.* (2000), a manutenção de parte do material do ninho já utilizado no momento da troca, conforme realizado neste estudo, reduz comportamentos agonísticos. Os comportamentos agonísticos, ainda que ocorram de forma natural na espécie, quando apresentam frequência reduzida estão associados a melhores condições de BEA. O fornecimento do EA nas condições deste trabalho demonstrou-se eficaz na redução dos comportamentos agonísticos pós-limpeza da caixa.

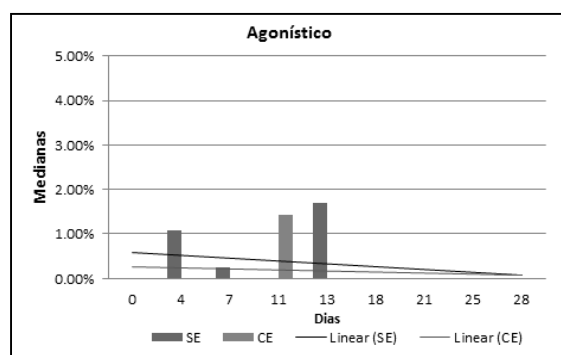


Figura 3 - Medianas de comportamento AGO ao longo dos dias, apresentado pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas sem enriquecimento (SE) e pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com

enriquecimento ambiental (CE), no período de maio a junho de 2012.

No grupo CE, houve variação ($P < 0,05$) de IE, evidenciando uma diminuição ao longo dos dias, passando de 29% no primeiro dia para 1% no último dia (Figura 4). Esse resultado pode ser comparado com o obtido no trabalho de Arey (1992), que observou que porcas pré-parturientes pressionavam muito mais frequentemente um painel para ter acesso a uma sala contendo alimento até dois dias antes do parto. Neste momento, o alimento era mais importante para as porcas do que a palha para manipulação ou construção do ninho. Entretanto, no dia anterior ao parto, quando normalmente seria construído um ninho, as porcas pressionaram o painel com similar frequência para obtenção de palha e de comida. O resultado obtido no presente estudo evidencia que em camundongos o material para ninho também pode se tornar mais importante no pré-parto e nos primeiros dias pós-parto, enquanto os filhotes ainda são pequenos, deixando de ter grande importância quando os filhotes já estão maiores. No entanto, Gaskill *et al.* (2013) estudando o fornecimento de material de ninho para camundongos adultos, observaram que os animais utilizaram o material como um meio para aliviar o estresse térmico, diminuir a variabilidade na temperatura do corpo, e normalizar as taxas metabólicas, resultando em menor consumo de alimento e maior peso corporal. Os resultados de Gaskill *et al.* (2013) também contradizem os do presente estudo pois observaram que os camundongos machos escolhem temperaturas ligeiramente mais frias do que as fêmeas e, que as fêmeas tem uma faixa de conforto térmico mais elevada do que os machos, assim, 8 g de material de ninho parece ser suficiente para aliviar o estresse térmico em

machos, mas não totalmente nas fêmeas a 20°C.

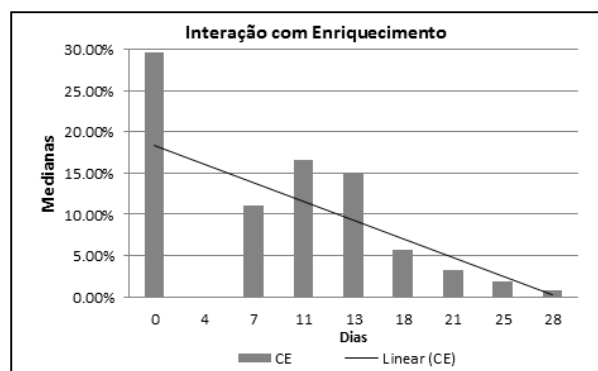


Figura 4 - Medianas de comportamento IE ao longo dos dias, apresentado pelas seis fêmeas de camundongos Swiss mantidas com enriquecimento ambiental (CE), no período de maio a junho de 2012.

No período de observação as atividades de repouso tiveram menor ocorrência. No dia em que as observações foram realizadas mais cedo (D4), entre as 08:20h e as 08:50h da manhã, a maior parte do tempo foi utilizado pelas fêmeas para comportamentos de autocuidado e exploratório, não havendo interação com o EA. Nas observações seguintes à disponibilização a construção de ninhos indicou que os animais fizeram uso do papel posteriormente. Nos períodos em que os camundongos estão em repouso, sua temperatura corporal reduz e o controle é realizado pela utilização de materiais para ninho, postura corporal encurvada e proximidade física com outros indivíduos (Gaskill, 2013). A construção de ninhos é um fator importante para roedores e está associada com a capacidade dos indivíduos de contribuir com os seus genes para as gerações seguintes (Lynch e Hegmann, 1973). Este é um dos itens de maior acessibilidade no cotidiano laboratorial. Se disponibilizado para os animais, eles têm maior controle

sobre o microambiente e assim podem atingir melhores condições de conforto e possibilidades comportamentais, melhorando o grau de BEA. No caso do papel, apesar de apresentar menor uso durante as análises, sendo um item manipulável, foi possível observar evidências de sua utilização pela montagem do ninho. A utilização dos itens foi favorável, indicando aumento na expressão de comportamentos naturais e, consequentemente, mais alto grau de BEA.

Para um entendimento mais detalhado sobre a utilização do EA seriam necessárias observações das atividades dos animais durante períodos mais longos, pois o acompanhamento da rotina pode trazer resultados mais precisos em relação aos comportamentos observados em situações de comparação da presença ou ausência de EA, incluindo a avaliação da presença de estereotípias. Sugere-se também que, juntamente com a observação do comportamento dos animais, sejam avaliadas as suas respostas fisiológicas, pois é necessário que qualquer avaliação de BEA inclua uma variada gama de mensurações. Igualmente, deve-se aprimorar o conhecimento das formas de associações entre as diferentes variáveis e suas consequências em relação à severidade do problema (Broom e Molento, 2004). Os metabólitos de glicocorticóides excretados por via fecal e/ou urinária podem oferecer um panorama mais acurado da intensidade da resposta ao estresse quando comparados com níveis séricos, uma vez que representam secreções cumulativas de horas ou dias dependendo da espécie (Schepop, 2008). Recentes estudos examinaram simultaneamente categorias de indicadores endócrinos e comportamentais na tentativa de avaliar o bem-estar psicológico, tendo nas variações das concentrações de cortisol um indicador da intensidade da resposta

a estímulos estressantes (Clarke *et al.*, 1995; Pizzutto *et al.*, 2009).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a utilização de enriquecimento ambiental, constituído de material de ninho, melhora o convívio entre os animais alocados em maternidade de biotério, diminuindo comportamentos agonísticos e favorecendo o comportamento natural de nidificação, principalmente antes do parto e nos primeiros dias pós-parto. Devido ao impacto positivo, mais estudos sobre as formas de enriquecimento ambiental para camundongos são relevantes, com a utilização de maior tempo de observação dos animais, em conjunto com outros indicadores de bem-estar animal.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Positivo por disponibilizar seu biotério para a realização deste trabalho e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida à primeira autora do presente trabalho no ano de 2012.

NOTAS INFORMATIVAS

Este projeto foi aprovado sob o protocolo nº. 19/2011 pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS

ABDI, H. Holm's Sequential Bonferroni Procedure. In: N.J. SALKIND; DOUGHERTY, D.M; FREY, B. (Ed.) Encyclopedia of Research Design. Thousand Oaks, CA: Sage, 2010, p. 573-577.

- ABOU-ISMAIL, U.A.; BURMAN, O.H.P.; NICOL, C.J.; *et al.* The effects of enhancing cage complexity on the behaviour and welfare of laboratory rats. *Behavioural Processes*, v. 85, p. 172-180, 2010.
- AMARAL, O.B.; VARGAS, R.S.; HANSEL, G.; *et al.* Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiology & Behavior*, v. 93, p. 388-394, 2008.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION – AVMA. Guidelines for the Euthanasia of animals, 2013 ed. Schaumburg: AVMA, 2013. 102 p.
- AREY, D.S. Straw and food as reinforcers for prepartal sows. *Applied Animal Behaviour Science*, Amsterdam, v.33, p. 217-226, 1992.
- BRASIL [2008]. Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008. Brasília, DF, Brasil: Imprensa Nacional. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm>. Acesso em: 31/03/2014.
- BRENNES, J.C.; RODRÍGUEZ, O.; FORNAGUERA, J. Differential effect of environmental enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in pré-frontal córtex and ventral striatum. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, Philadelphia: v. 89, p. 85-93, 2008.
- BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*, London: v. 142, p. 524-526, 1986.
- BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas – revisão. *Archives of Veterinary Science*. v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.
- BURN, C.C.; PETERS, A.; DAY, M.J.; *et al.* Long-term effects of cage-cleaning frequency and bedding type on laboratory rat health, welfare, and handle ability: a cross-laboratory study. *Laboratory Animals*, v. 40, n. 4, p. 353-370, 2006.
- BURN, C.C.; MASON, G.J. Effects of cage-cleaning frequency on laboratory rat reproduction, cannibalism, and welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 114, p. 235-247, 2008.
- CHAMOVE, A.S. Cage design reduces emotionality in mice. *Laboratory Animals*, v. 23, n. 3, p. 215-219, 1989.
- CLARKE, A.S.; CZEKALA, N.M.; LINDBURG, D.G. Behavior and adrenocortical responses of male cynomolgus and lion-tailed macaques to social stimulation and group formation. *Primates*, v. 36, p. 41-56, 1995.
- FRAJBLAT, M.; AMARAL, V.L.L.; RIVERA, E.A.B. [2008]. Ciência em animais de laboratório. *Ciência e Cultura*, vol. 60, n. 2, p. 44-46. Disponível em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v60n2/a19v60n2.pdf>> Acesso em 03 abr. 2012.
- FOX, C.M.Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, v. 175, p. 1-8, 2006.
- GASKILL, B.N. The naked truth: breeding performance in nude mice with and without nesting material. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 143, p. 110-116, 2013.
- GASKILL, B.N.; GORDON, C.J.; PAJOR, E.A.; *et al.* Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiology & Behavior*, v. 110-111, p. 87-95, 2013.
- GRAY, S.; HURST, J.L. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal Behaviour*, v. 49, p. 821-826, 1995.
- GROSS, A.N.; ENGEL, A.K.J.; WÜRBEL, H. Simply a nest? Effects of different enrichments on stereotypic and anxiety-related behaviour in mice. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 134, p. 239-245, 2011.
- JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W.H. ACTH-Induced excessive grooming in the rat: the influence of environmental and motivational factors. *Hormones and behavior*, v. 12, p. 60-72, 1979a.
- JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W.H. Novelty and Grooming behavior in the rat. *Behavioural and Neural Biology*, v. 25, p. 563-572, 1979b.
- LYNCH, C.B.; HEGMANN, J.P. Genetic differences influencing behavioral temperature regulation in small mammals, II genotype-environment interactions. *Behavior Genetics*, v. 3, p. 145-154, 1973.
- MARASHI, V.; BARNEKOW, A.; OSSENDORF, E.; *et al.* Effects of diferente forms of enrrironmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior*, v. 43, p. 281-292, 2003.
- MELLEN, J.; MACPHEE, M.S. Philosophy of environmental enrichment: past, present, and future. *Zoo Biology*, v. 20, p. 211-226, 2001.
- MENCH, J.A. Environmental Enrichment and the Importance of Exploratory Behavior. In:

- SHEPHERDSON, D.J.; MELLEN, J.D.; HUTCHINS, M. (Ed). *Second Nature: environmental enrichment for captive animals*. California: Smithsonian Books. p. 30-46, 1998.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES – NAS *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8 ed. Washington: National Academies Press, 2010.
- PIETROPAOLO, S.; BRANCHI, I.; CIRULLI, F.; *et al.* Long-term effects of the periadolescent environment on exploratory activity and aggressive behaviour in mice: social versus physical enrichment. *Physiology & Behavior*, v. 81, p. 443-453, 2004.
- PIZZUTTO, C.S.; SGAI, M.G.F.G.; GUIMARÃES, M.A.B.V. [2009]. O enriquecimento ambiental como ferramenta para melhorar a reprodução e o bem-estar de animais cativos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.33, n.3, p.129-138, jul./set. 2009. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag129-138.pdf>>. Acesso em 04 abr. 2012.
- REINHARDT, V.; REINHARDT, A. *Variables, refinement and environmental enrichment for rodents and rabbits kept in research institutions – making life easier for animals in laboratories*. Animal Welfare Institute: Washington, DC. 2006.
- ROSENFELD, A.; WELLER, A. Behavioral effects of environmental enrichment during gestation in WKY and Wistar rats. *Behavioral Brain Research*, v. 233, p. 245-255, 2012.
- SCHEPOP, J.A. *Enriquecimento ambiental, condicionamento animal, Petting e recompensas alimentares: o que aumenta o bem-estar em Hamsters Sírios?*. 2008. Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Zoologia dos Vertebrados), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
- VAN HERCK, H.; BAUMANS, V.; DE BOER, S.F. *Assessment of discomfort in laboratory animals*. In: COHEN, J.; MILLER, A. eds. *Autoimmune disease models, a guidebook*. Academic Press, New York, 1994, p. 303-320.
- VAN LOO, P.L.P.; KRUITWAGEN, C.L.J.J.; VAN ZUTPHEN, L.F.M.; *et al.* Modulation of aggression in male mice. *Animal Welfare*, v. 9, p. 281-295, 2000.
- VIVINETTO, A.L.; SUÁREZ, M.M.; RIVAROLA, M.A. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, v. 240, p. 110-118, 2013.
- WOLFENSOHN, S. Euthanasia and other fates for laboratory animals. In: R. HUBRECHT; J. KIRKWOOD (ed) *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p. 219-226, 2010.
- ZIMMERMANN, A.; STAUFFACHER, M.; LANGHANS, W.; *et al.* Enrichment dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behavioural Brain Research*, v. 121, p. 11-20, 2001.